

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO
UNAERP

Variabilidade Química de Óleo Essencial em Três Quimiotipos de *Lippia
alba* (Mill.) N.E. Br. ex Britton & P. Wilson

Mestranda: Luciana Aparecida Santiago da Silva
Orientadora: Prof. Dra. Bianca Waleria Bertoni
Coorientadora: Prof. Dra. Ana Maria Soares Pereira

Ribeirão Preto
2020

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento
Técnico da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

S586v Silva, Luciana Aparecida Santiago da, 1985-
Variabilidade química de óleo essencial em três quimiotipos
de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. ex Britton & P. Wilson / Luciana
Aparecida Santiago da Silva. - - Ribeirão Preto, 2020.
36 f.: il. color.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Bianca Waleria Bertoni.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Ribeirão Preto,
UNAERP, Biotecnologia. Ribeirão Preto, 2020.

1. *Verbenaceae*. 2. Planta Medicinal. 3. Cromatografia Gasosa.
I. Título.

CDD 660

LUCIANA APARECIDA SANTIAGO DA SILVA

VARIABILIDADE QUÍMICA DE ÓLEO ESSENCIAL EM TRÊS QUIMIOTIPOS DE
LIPPIA ALBA (MILL.) N.E. BR. EX BRITTON & P. WILSON

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde

Data da defesa: 19 de agosto de 2020

Resultado: Aprovada

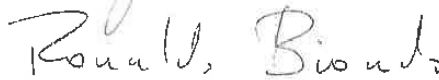
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Bianca Waleria Bertoni
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP



Profa. Dra. Juliana da Silva Coppede
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP



Prof. Dr. Ronaldo Biondo
Nidus-Tec-Desenvolvimento de Processos Tecnológicos LTDA. - TecBio & Nidus-Tec

RIBEIRÃO PRETO
2020

DEDICATÓRIA

Aos meus amigos que me acompanham desde o principio desta jornada, me apoiando e me insentivando sempre: Mariana e Paulo

Á minha namorada Grazi, que apesar de chegar já nos passos finais do caminho me amparou de forma incrível e principalmente pela paciência ate a conclusão.

Agradecimentos

À minha orientadora Prof. Dra. Bianca Waleria Bertoni e co-orientadora Prof. Dra. Ana Maria Soares Pereira pela condução impecável deste e de outros trabalhos, foi um grande prazer estar na presença de pessoas tão dedicadas e inspiradoras.

À Prof. Dra. Silvia Helena Taleb Contini pela contribuição na construção desta dissertação e ao longo da minha vida acadêmica.

Aos amigos professores e doutores que fiz durante este período que sempre estiveram dispostos a compartilhar um pouco do que sabem e do qual sou imensamente grata: Juliana, Edieidia e o Tiago.

A CAPES pela bolsa de mestrado possibilitando assim a concretização desta pesquisa.

RESUMO

A espécie *Lippia alba* (*Verbenaceae*), popularmente conhecida no Brasil como erva-cidreira, produz óleo essencial que pode ser de interesse à indústria farmacêutica e de cosméticos. Entretanto, em razão de fatores bióticos e abióticos o metabolismo das plantas sofre alterações por haver interação com o seu habitat natural. Em geral espécies acumulam predominantemente uma determinada substância, dentro de uma classe de compostos. Quimiotipos são indivíduos de uma mesma espécie que diferem entre si por apresentarem composto majoritário distinto, tanto quantitativa quanto qualitativamente, mesmo quando são cultivados no mesmo local. Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar os constituintes majoritários dos óleos essenciais produzidos por diferentes quimiotipos de *L. alba*, cultivados na Coleção de Plantas Medicinais da Farmácia da Natureza, para garantir o controle de qualidade de fitoterápicos que contenham *L. alba* em sua formulação. Folhas de três quimiotipos de *L. alba*, foram colhidas na Coleção de Plantas Medicinais da Farmácia da Natureza e após o processo de secagem em estufa de ar circulante o óleo essencial do material vegetal seco foi extraído por arraste a vapor em aparelho clewenger. O perfil químico do óleo extraído foi analisado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). O óleo essencial do quimiotipo LA2 foi o que apresentou um maior número de compostos (20), enquanto os quimiotipos LA1 e LA3 apresentaram 13 e 9 compostos, respectivamente. Os três quimiotipos avaliados diferiram quanto aos compostos majoritários ficando evidenciada a necessidade de determinar e quantificar os compostos produzidos nos diferentes quimiotipos, para que na dispensação feita na Farmácia Viva, o fitoterápico contendo *L. alba* mantenha o padrão de qualidade produzindo os efeitos terapêuticos desejados.

Palavras chaves: *Verbenaceae*, Planta Medicinal, Cromatografia Gasosa.

ABSTRACT

The species *Lippia alba* (Verbenaceae), popularly known as lemon balm, accumulated essential oil that may be of interest in the pharmaceutical and cosmetics industry. However, the metabolism of plants altered by abiotic and biotic factors, interacting with the environment in which they live. In general, each species accumulates predominantly a specified substance, within a class of compounds. The chemotypes belong to the same species and are different in that they present a different major compound, both quantitatively and qualitatively, even when they are grown in a single location. Thus, the objective of this work was to identify the main chemical compounds of *L. alba* chemotypes, grown in the Collection of Medicinal Plants of the Nature Pharmacy, with a view to contributing to the quality control of herbal medicines used with a species. Leaves of three *L. alba* chemotypes were collected in the Medicinal Plants Collection of the Nature Pharmacy and after drying in a circulating air oven or plant material submitted to the extraction of essential oil by steam extraction in the Clevenger device. The chemical composition was identified by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The LA2 chemotype was the one with the largest number of compounds present in the essential oil, having identified 20 substances, while the LA1 and LA3 chemotypes had 13 and 9 compounds, respectively. The three chemotypes used differ in terms of the main compounds, highlighting the need to identify the chemotypes for the production of phytotherapies at Farmácia Viva, as the therapeutic effects used are different.

Keywords: *Verbenaceae*, Medicinal Plant, Gas Chromatography.

Lista de Figuras

- Figura 1.** Plantas de *Lippia alba*. Quimiotipos LA1, LA2 e LA3 22
- Figura 2.** Análise de agrupamento entre os três quimiotipos de *Lippia alba*. 24
- Figura 3.** Análise de agrupamento entre os constituintes químicos para cada quimiotipo de *Lippia alba*. 25
- Figura 4.** Análise de agrupamento entre os quimiotipos, LA1 (a), LA3 (b) e LA2 (c) de *Lippia alba*. 26
- Figura 5.** Estrutura química do geranial (A), neral (B), beta-linalol (C) e d-carvona (D). 27
- Figura 6.** Análise de agrupamento entre os constituintes presentes nos quimiotipos, LA1 (a) e LA2 (c) de *Lippia alba*. 27
- Figura 7.** Análise de agrupamento entre os constituintes presentes nos quimiotipos, LA1 (a) e LA3 (b) de *Lippia alba*, LA2 (c) e LA3 (b) de *Lippia alba*. 27
- Figura 8.** Análise de agrupamento entre os constituintes presentes nos quimiotipos, LA2 (c) e LA3 (b) de *Lippia alba*. 29

Lista de Tabelas

Tabela 1. Rendimento de óleo essencial nos quimiotipos de *Lippia alba*. 22

Tabela 2. Constituintes presentes no de óleo essencial nos quimiotipos de *Lippia alba*. 22

Lista de Abreviaturas

ANOVA - Análise de Variância

CG - Cromatografia Gasosa

CG-EM - Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas

EM - Espectrometria de Massas

SISVAR - Sistema para Análise de Variância de Dados Balanceados

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Planta Medicinal	13
2.2 Variabilidade Química em Plantas Medicinais	14
2.3 Quimiotipos	15
2.4 Cromatografia Gasosa	16
2.5 Óleo Essencial	16
2.6 <i>Lippia alba</i>	16
3. JUSTIFICATIVA	19
4. HIPÓTESE	19
5. OBJETIVOS	19
5.1 Objetivo Geral	19
5.2 Objetivos Específicos	19
6. MATERIAL E MÉTODOS	20
6.1 Extração do Óleo Essencial	20
6.2 Análise Cromatográfica	20
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
8. CONCLUSÃO	30
9. REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são usadas em várias culturas por milênios e o conhecimento dos efeitos terapêuticos é passado de geração em geração, com as instruções de usos e forma de coleta das mesmas.

A maioria destas plantas precisam de estudos aprofundados nas áreas de biologia, farmacologia e química para garantir a sua segurança, eficiência e qualidade, elucidando sua melhor forma de uso.

O que confere o efeito terapêutico destas plantas são os metabólitos secundários, em geral são utilizados como defesa e podem variar conforme diversas interações com o ambiente.

Entre os metabólitos secundários gerados pelas plantas destacam-se os óleos essenciais produzidos por plantas aromáticas pertencentes a várias famílias em especial a *Verbenaceae*.

A espécie *Lippia alba* (*Verbenaceae*) apresenta ampla distribuição no Brasil, é conhecida popularmente como erva-cidreira e acumula óleo essencial que pode ser de interesse para a indústria farmacêutica e de cosméticos. Sua vasta utilização na medicina popular e na fitoterapia é decorrente da ampla variabilidade química de seus óleos essenciais. Porém, para garantir a qualidade da matéria prima na elaboração dos produtos fitoterápicos eficazes e seguros, faz-se necessário a realização de estudos que permitam distinguir os quimiotipos de *L. alba*, com base na relação entre seus compostos majoritários.

Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar os constituintes majoritários dos óleos essenciais de quimiotipos de *L. alba*, cultivados na Coleção de Plantas Medicinais da Farmácia da Natureza, com vistas a contribuir com o controle de qualidade de fitoterápicos produzidos com esta espécie.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plantas Medicinais

Os conhecimentos sobre as plantas medicinais são passados de geração em geração, fazendo parte cultural de inúmeras comunidades situadas em todo o mundo (PARTHIBAN et al., 2016).

Mais de 50 mil espécies de plantas são consideradas como medicinais, porém estão distribuídas de forma heterogênea no mundo, a Índia e a China possuem juntas quase 20 mil espécies. Com o avanço das fronteiras agrícolas e desmatamento, estas espécies correm o risco de serem extintas antes de serem estudadas. É muito importante conhecer as espécies medicinais e manter seu habitat, pois as propriedades medicinais podem variar uma vez que a produção dos princípios ativos variam com o ambiente (CHEN et al., 2016).

Muitas plantas utilizadas na medicina popular não têm indicações médicas comprovadas e sua toxicidade é desconhecida. Com a falta de informações e a falsa ideia que algo de origem natural pode ser usado indistintamente, espécies usadas como medicinais podem oferecer graves riscos à saúde. Além disso, a superdosagem e o uso contínuo, pode provocar alergias e interação com outros medicamentos, quando usados simultaneamente (SILVEIRA; BANDEIRA; ARRAIS, 2008).

A comercialização de plantas medicinais em feiras livres é comum, um exemplo são as encontradas no município de Arapiraca-AL: *Sambucus australis* (sabugueiro) usada para tosse, gripe e febre; *Pimpinella anisum* L. (erva-doce) como calmante e problemas de intestino; *Maytenus ilicifolia* Mart. (espinheira-santa) anti-inflamatória e problemas circulatórios; *Bauhinia chelantha* (pata-de-vaca) usada para diabetes; *Phyllanthus nirui* L. (quebra-pedra) problemas de menstruação e rins (LIMA; NASCIMENTO; COSTA et al., 2017).

As propriedades medicinais nas plantas são atribuídas aos metabolitos secundários. Os mais comuns são os terpenoides com mais de 30 mil elementos retratados e dentro dessa classe de compostos os óleos essenciais se destacam

pelas inúmeras atividades biológicas que apresentam (LIMA; KAPLAN; CRUZ, 2003).

Estas estruturas voláteis além dos terpenos, contem álcoois, ésteres, hidrocarbonetos, podendo ser saturados ou insaturados e são extraídos de qualquer parte da planta. São usados em cosméticos, fragrâncias e na aromaterapia. Óleos essenciais como o de *Eucalyptus globulus* e *Rosmarinus officinalis* tem atividade bactericida, os óleos de *Artemisia sieberi* e *Mentha piperita* apresentam ação antifúngica, entre outros (ALI et al., 2015).

Vários compostos derivados do metabolismo secundário de plantas são usados como princípio ativo na produção de medicamentos. Por exemplo, os produtos naturais originados de sínteses de plantas são usados para a produção de fármacos, seja em sua forma original ou baseados em suas estruturas. Podemos citar a morfina que foi isolada da planta *Papaver sonniferum*, o medicamento para tratamento do câncer, Taxol® produzido a partir do *Taxus brevifolia*, o conhecido AAS (ácido acetilsalisílico) extraído do *Salix* sp e o Acheflan anti-inflamatório produzido a partir do óleo essencial da espécie *Cordia verbenacea* (BARREIRO; BOLZAN, 2009; NASRI; SHIRZAD, 2013).

2.2 Variabilidade Química em Plantas Medicinais

O metabolismo secundário das plantas sofre alterações por fatores abiótico e biótico. Ainda que seja controlado geneticamente, cada planta interage com o meio ambiente em que vive, sintetizando os seus compostos conforme é exigido pelo seu habitat, podendo variar durante o dia, conforme a temperatura, luminosidade e entre espécies (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Plantas colhidas em épocas e lugares diferentes e a forma que são estocadas fazem com que cada uma apresente quantidades distintas dos seus compostos químicos e com isto o conhecimento e a padronização destas composições são importantes para seu uso fitoterápico. Um exemplo disto foi observado em três amostras de *Rosmarinus officinalis* cultivadas na cidade de Juiz de Fora (MG) colhidas no mesmo dia, em lugares diferentes tiveram variação nos flavonoides e este estudo demonstrou também que a forma em que é feita a extração influencia no resultado final (ALMEIDA et al., 2010).

Folhas de *Maytenus aquifolium*, conhecida popularmente por espinheira santa, coletadas em Ribeirão Preto (SP) por 4 anos, em estações diferentes, tiveram variação nas suas quantidades de triterpenos totais, fenóis e flavonoides, variando não só nas diferentes estações como nos anos coletados (YARIWAKE et al., 2005).

A *Hortia oreadica* Groppo, planta nativa colhida em Goiás, conhecida como “para-tudo” e usada para tratar dor de estômago e febre pela população local, apresentou variabilidade química entre as folhas, flores e frutos colhidos da mesma planta e na mesma época do ano. Folhas colhidas de julho de 2012 a julho de 2013, flores colhidas em novembro de 2012 e frutos colhidos em janeiro de 2013 mostram a variação de diferentes compostos químicos das folhas coletadas de mês a mês e entre flores e frutos (SANTOS et al., 2016).

Estudo com a *L. alba* realizado na cidade de Santarém, no Pará demonstra a diferença da quantidade de citral (trans-citral e cis-citral) em estações distintas, sendo a maior produção em estação seca com 66% contra a 49 % em estação chuvosa (JUNIOR et al., 2019).

2.3 Quimiotipos

Plantas que produzem predominantemente uma determinada substância, dentro de uma classe de compostos, diferenciando-se por esta característica dos demais indivíduos da mesma espécie são denominadas quimiotipos. Assim, indivíduos de uma mesma espécie podem ser morfologicamente idênticos e ao mesmo tempo apresentar composição química distinta, em função de alterações genéticas ou epigenéticas. A seleção adequada de quimiotipos pode ser fundamental para garantir a atividade terapêutica das espécies e, além disso, em algumas situações, podem determinar a segurança da planta medicinal, quando indivíduos que acumulam elevado teor de substâncias tóxicas são identificados e não utilizados (PEREIRA, 2020).

A espécie *L. alba* pode ser encontrada em quase todo o território brasileiro, podendo se diferenciar tanto morfologicamente como em compostos de seus óleos essenciais dependendo do seu local de coleta (TAVARES et al., 2005a). Estas

diferenças ocorrem devido a sua interação com o ambiente e com isso a ação farmacológica pode ser alterada em função do quimiotipo.

Plantas de *L. alba* ricas em citral apresentaram efeito calmante e espasmódico e aquelas mais produtoras de limoneno e a carvona terão predominantemente efeito expectorante. Esta variação pode ocorrer dentro de uma mesma região ou em regiões distantes (JUNIOR et al., 2019). O conhecimento destas variações é extremamente importante para a produção segura de fitoterápicos (JANNUZZI et al., 2010).

2.4 Cromatografia Gasosa

A cromatografia gasosa (CG) é um dos métodos mais eficientes para o estudo da composição dos óleos essenciais.

Esta técnica consiste de um gás de arraste como fase móvel e uma fase estacionária líquida depositada sobre um suporte sólido. É uma técnica que possibilita detectar em escala de nano a picogramas de amostra, limitando-se apenas a analisar amostras gasosas com estabilidade térmica. A coluna utilizada tem aproximadamente 3 mm de diâmetro e mede por volta de 3 m. Para a fase móvel, os gases comumente utilizados são o hélio, hidrogênio e nitrogênio hélio e por causa da pureza. As fases estacionárias podem ser apolares, polares ou quirais. Seus detectores podem ser de condutividade térmica, ionização em chamas e massas. A análise é realizada através de dados cromatográficos, verificando o tempo de retenção das substâncias eluídas da coluna, e de dados obtidos dos espectros de massas, quando utilizado o detector de massas (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

A espectrometria de massas (EM) é uma técnica analítica sensível e capaz de identificar a estrutura da molécula orgânica, de acordo com os dados obtidos (ZHAO et al., 2019).

As técnicas analíticas de espectrometria de massas e cromatografia gasosa quando estão acopladas (CG-EM) resultam em eficiente separação, identificação estrutural e informações referentes a fórmula e massa molecular de compostos detectados (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

2.5 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais fazem parte do metabolismo secundário das plantas, conferindo a elas proteção. São formados por sesquiterpenos, monoterpenos, fenilpropanoides e isotiocianato (SOUZA et al., 2017).

Os óleos essenciais são extraídos por hidrodestilação de praticamente todas as partes das plantas e as concentrações podem variar conforme o local da coleta e a espécie analisada (CUSTÓDIO et al., 2010).

De modo geral, plantas aromáticas geralmente são encontradas em regiões de clima quente e temperados, sendo utilizadas na medicina popular para diversos fins, além de ser importante para a produção de cosméticos (BADREDDINE et al., 2015). Plantas produtoras de óleo essencial também podem ser usadas na aromaterapia, em alimentos, produtos de higiene e recentemente estudos estão sendo feitos apontando seu uso como pesticidas (ZABKA; PAVELA; SLEZAKOVA, 2009).

2.6 *Lippia alba*

Com cerca de 36 gêneros e 1000 espécies, a família *Verbenaceae* está presente em todas as regiões tropicais do planeta. No Brasil, esta família possui 16 gêneros e 290 espécies. As plantas desta família são comumente encontradas nas formas de ervas, arbustos, subarbustos e lianas (ALMEIDA et al., 2018).

Sendo considerada uma subfamília *Verbenoideae*, a família *Verbenaceae* sofreu algumas alterações ao longo do tempo, perdendo alguns gêneros como *Callicarpa*, *Clerodendron* e *Tetraclea* que se tornaram parte de outra família. Integrantes dessa família contêm compostos fenólicos e flavonoides que podem ser usados como marcadores para a espécie (ÁVILA-REYES et al., 2017).

Com mais de 200 espécies distribuídas pela América central e sul, além da África tropical, o gênero *Lippia* apresenta-se na forma arbustiva ou árvores de pequeno porte. Essas plantas da família *Verbenaceae* estão muito presentes na medicina tradicional, sendo conhecida no Brasil pelo nome popular de erva-cidreira (SILVA et al., 2018).

Algumas pesquisas mostram as seguintes atividades para *L. alba*: anti-inflamatória (MONTEIRO et al., 2007), antimicrobiana (PINA, 2010) e larvicida (FURTADO et al., 2005; COSTA et al., 2005; SANTIAGO et al., 2008).

A *Lippia javanica*, é rica em carvona, ipsenona, linalol, micernona e piperitenona inibindo o crescimento dos microrganismos *Cryptococcus neoformans*, *Bacillus cereus*, *Cryptococcus neoformans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, e apresenta efeito bacteriostático contra a *Klebsiella pneumoniae* e o protozoário *Plasmodium falciparum* em baixas concentrações (MANENZHE et al., 2004; VILJOEN et al., 2005).

Outra espécie estudada é a *Lippia multiflora* que tem como composto majoritário o carvacrol, apresentando atividades antioxidante e antimicrobiana contra *Candida albicans* e *Pseudomonas aeruginosa* (AGNANIET et al., 2005; KUNLE et al., 2003).

A espécie *L. alba* pode medir até 1,7 metros de altura, com galhos quadrangulares, folhagens opostas ou alternadas, membranáceas, com pecíolos pubescentes, apresentado a base em forma de cone com a beirada de serra, recortada com flores rosas ou brancas que medem entre 3 e 5 mm. Possui duas sementes marrons em seu fruto indeiscentes de 2 núcleos (HENNEBELLE et al., 2008).

Uma das principais características de *L. alba* é a sua variedade de compostos químicos, com uma grande diversidade de monoterpenos, podendo ter a sua quantidade alterada conforme seu local de coleta. Com isto os usos na medicina popular são diversos (JANNUZZI et al., 2011).

As principais atividades farmacológicas são: analgésica, ansiolítica, antimicrobiana, antiviral e sedativa, o óleo essencial apresenta majoritariamente carvona, citral e linalol (BATISTA et al., 2018; MESA-ARANGO et al., 2009).

O linalol é uma substância importante na perfumaria e também apresenta atividades anticonvulsivante, antioxidante, anti-inflamatória e sedativo, agindo também contra bactérias, fungos e insetos. Outro composto igualmente relevante é a carvona que apresenta atividade contra bactéria, nematoide e fungos, além da função de alelopatia (TAVARES et al., 2005b).

3 JUSTIFICATIVA

Extratos da espécie *Lippia alba* são utilizados amplamente como fitoterápicos e a presença de aproximadamente 1% de óleo essencial é determinante para a atividade ansiolítica preconizada para a espécie. Dependendo das substâncias majoritárias presente no óleo essencial haverá maior ou menor atividade farmacológica. Assim, é importante estabelecer os quimiotipos utilizados em programas de saúde, como por exemplo, em Farmácias Vivas.

4 HIPÓTESE

Quimiotipos de *Lippia alba* utilizados em Farmácia Viva apresentam variabilidade quanto aos constituintes majoritários presentes nos óleos essenciais, com isto há ações específicas para cada quimitipo.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Identificar os constituintes majoritários dos óleos essenciais dos quimiotipos de *L. alba*, cultivados na Coleção de Plantas Medicinais da Farmácia da Natureza, com vistas a contribuir com o controle de qualidade de fitoterápicos produzidos com a espécie.

5.2 Objetivos Específicos

- Coletar os indivíduos na Coleção de Plantas Medicinais da Farmácia da Natureza;
- Extrair o óleo;
- Calcular o rendimento;
- Identificar os compostos majoritário por CG-EM.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Extração do Óleo Essencial

Para a extração dos óleos essenciais de *L. alba*, foram colhidas três plantas na Coleção de Plantas Medicinais da Farmácia da Natureza (Jardinópolis-SP). Os quimiotipos foram colhidos entre quinze a dezessete de abril 2019. O material vegetal foi pesado e colocado para secar em estufa de ar circulante a temperatura de 45°C por 48 horas. Em seguida o material seco foi pesado e submetido à extração por arraste a vapor, utilizando um aparelho clewenger acoplado em um balão de 2 L de fundo redondo. A extração foi realizada em 2 horas sobre uma manta térmica na temperatura de 100 °C. Após este tempo foi obtido água e óleo sendo retirado o óleo com o uso de pipeta pasteur, armazenados em frascos identificados e devidamente fechados foram congelados até o dia da análise.

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético foi cadastrada no SisGen (nº do cadastro A909B94).

6.2 Análise Cromatográfica

A verificação dos compostos presentes em cada um dos óleos foi feita por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), em aparelho Varian 3900 com detector seletivo de massa, modelo Saturn 2100T. As condições de análise foram: Coluna capilar: DB-5 (30m x 0,25mm x 0,25µm); Temperatura do injetor: 240 °C; Temperatura do detector: 230 °C; Impacto de Elétrons: 70 eV; Gás de arraste: He; Fluxo: 1,0 mL/min,; Split: 1/20; Programa de Temperatura: 60°C – 240°C, 3°C/minuto. Volume de Injeção: 1 µL de solução (1 µL óleo essencial / 1 mL Acetato de etila - AcOEt).

Para determinar os constituintes das amostras foi feita a comparação dos resultados do CG-EM com a base de dados do sistema (NIST 62 lib.) e índice de retenção de kovats (ADAMS, 1995). As análises foram realizadas na Unidade de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP.

6.2 Análises dos dados

As análises de rendimento de óleo, foram realizadas em triplicata. Os resultados foram submetidos à ANOVA através do programa SISVAR V.4.3 (FERREIRA 2003), sendo as médias dos tratamentos comparados pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância (SCOTT-KNOTT 1974).

Foi gerada uma matriz das variáveis quantitativas baseada na distância euclidiana e a partir desta matriz foi realizado o agrupamento utilizando o método hierárquico de ligação média entre grupos (*Unweighted Pair-Group Average – UPGMA*).

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O rendimento do óleo essencial entre os três quimiotipos de *L. alba* (Figura 1) apresentaram diferença significativa. A maior produção de óleo essencial foi observada no quimiotipo LA3 com um rendimento de 1,3 vezes a mais que os quimiotipos LA1 e LA2 (Tabela 1).

Sabe-se que dentre os vários quimiotipos de *L. alba* três deles apresentam citral, carvona ou linalol como componentes majoritários em seus óleos essenciais (Tavares et al., 2005a,b). A análise realizada por CG-EM permitiu a identificação de 13 constituintes presentes no quimiotipo linalol (LA1), representando 97,87% do óleo essencial, no quimiotipo citral (LA2) os 20 constituintes detectados corresponderam a 94,24% e o quimiotipo carvona (LA3) apenas nove constituintes representaram 99,62% (Tabela 2). Tavares et al. (2005a) também identificaram os mesmos quimiotipos em *L. alba*, carvona, citral e linalol, com diferença no rendimento do óleo essencial, entretanto o número de constituintes identificados em cada quimiotipo foi maior do que o material cultivado na Coleção de Plantas Medicinais da Farmácia da Natureza.

Figura 1. Plantas de *L. alba*. Quimiotipos LA1, LA2 e LA3



Fonte: Ana Maria Soares Pereira

Tabela 1. Rendimento de óleo essencial nos quimiotipos de *Lippia alba*

Quimiotipos	$\mu\text{L} / \text{g}^{-1} \text{PS}$
LA1	10,09b
LA2	10,20b
LA3	14,10a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Scott Knott a 5 % de probabilidade

Tabela 2. Constituintes presentes no de óleo essencial nos quimiotipos de *Lippia alba*

Constituintes	LA1 Concentração relativa %	LA2 Concentração relativa %	LA 3 Concentração relativa %
alfa.-tujeno	-	0,16	0,08
alfa.-pineno	-	0,65	-
sabineno	1,03	0,14	-
beta-mirceno	-	11,03	0,18
p-cimeno	-	0,18	-
limoneno	0,10	0,28	21,70

1,8-cineol	5,46	-	-
beta-ocimeno	0,64	0,66	-
beta-linalol	62,61	0,59	0,16
cis-verbenol	-	0,40	-
beta-alilanol	-	-	5,96
beta-ciclocitral	3,18	-	-
cis-citral (neral)	4,59	21,99	-
d-carvona	-	-	67,71
piperitona	-	-	0,52
geraniol	-	0,52	-
trans-citral (geranial)	6,24	34,35	-
timol	-	-	-
carvacrol	-	-	-
beta- bourboneno	-	-	0,29
acetato de geraniol	-	4,23	-
beta.-cubebeno	-	0,51	-
beta-elemeno	0,47	1,41	-
trans-cariofileno	3,82	4,88	-
alfa-humuleno	-	-	-
trans-beta.- farneseno	-	0,34	-
germacreno D	4,96	2,94	3,02
germacreno A	1,14	-	-
cubebol	-	1,29	-
germacreno B	3,63	-	-
trans-nerolidol	-	1,57	-
óxido de cariofileno	-	6,12	-
Total	97,87	94,24	99,62

identificado (%)			
------------------	--	--	--

A análise de agrupamento realizada entre os quimiotipos utilizando as distâncias euclidianas, evidenciou o quimiotipo citral (LA2) como o quimiotipo mais diferente, este resultado está relacionado ao maior número de constituintes presentes no óleo essencial, que apresentou 20 substâncias distintas, enquanto que nos quimiotipos linalol (LA1) e carvona (LA3) foram identificados 13 e 9 constituintes respectivamente (Figura 2 e 3).

Estas variações encontradas no óleo essencial de *L. alba* são bem relatadas na literatura, portanto a identificação do quimiotipo garante a produção de matéria prima de qualidade visando a produção segura de fitoterápicos (LORENZI, MATOS 2002). Portanto para o estabelecimento de sistemas de cultivos comerciais, é necessário a instituição de programas de distribuição de mudas com identificação botânica e química dos acessos de *L. alba* (JANNUZZI et al., 2010)

Figura 2. Análise de agrupamento entre os três quimiotipos de *Lippia alba*

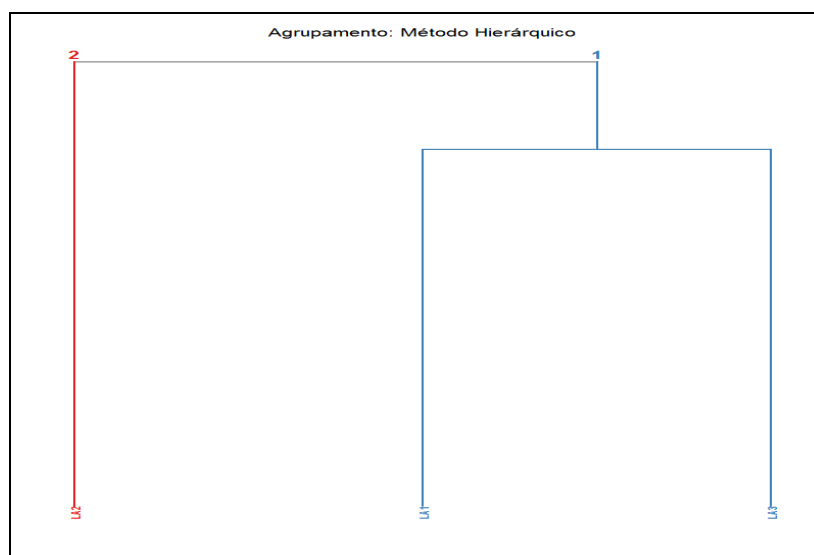
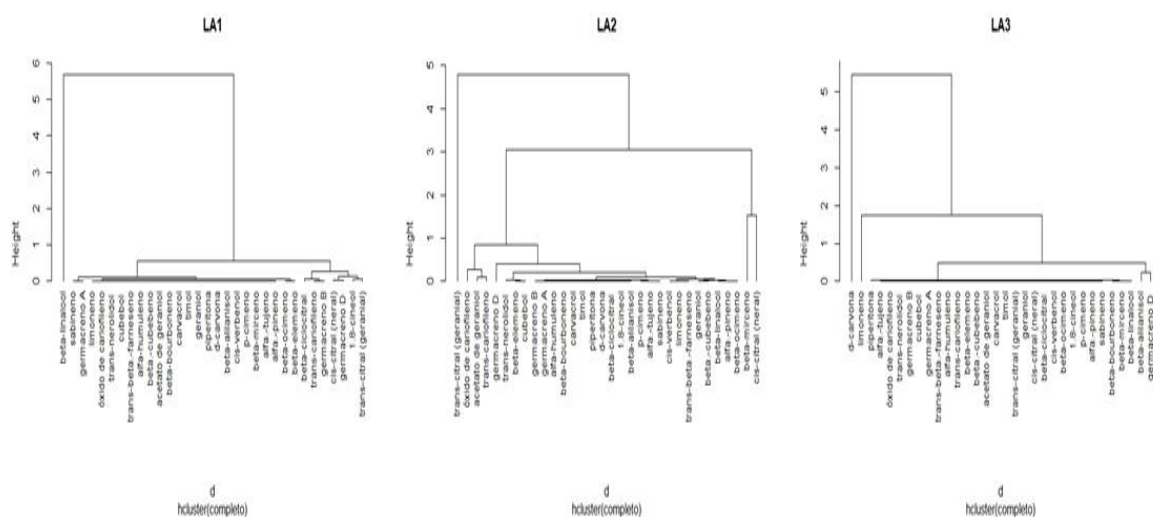


Figura 3. Análise de agrupamento entre os constituintes químicos para cada quimiotipo de *Lippia alba*



A análise de agrupamento realizada entre os constituintes presentes no óleo essencial de *L. alba*, evidenciou a separação dos genótipos em relação aos compostos majoritários (Figuras 3 e 4). Com exceção do quimiotipo LA2 que apresenta o trans-citral (geranial) e o cis-citral (neral) em maior concentração, 34,5% e 21,99 % respectivamente, os outros genótipos apresentam apenas um composto majoritário, beta-linalol (62,61%) em LA1 e d-carvona (67,71%) em LA3. O geranial e o neral são isômeros duplos. O trans-citral é conhecido por geranial ou citral A e o cis-citral é também denominado neral ou citral B (Figura 5). O geranial (trans-citral) também foi predominante em relação ao seu isômero cis-citral (neral) em estudo realizado por Cardoso et al. (2017), com o objetivo de avaliar a qualidade do fitoterápico produzido à base do Quimiotipo II (*Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown). Esta espécie, popularmente conhecida como cidreira, foi selecionada pelo Comitê Estadual de Fitoterapia para integrar o elenco de plantas medicinais de uso nas Farmácias Vivas do Estado do Ceará, fazendo parte da Relação de Plantas Medicinais-REPLAME/CE (Portaria 275/2012), como terapia complementar às crises de ansiedade e insônia de leves a moderadas (Cardoso et.al., 2017).

Esta variação de compostos majoritários em folhas de *L. alba* pode estar relacionada com o genótipo, condições edafoclimáticas, manejo da produção,

colheita e pós colheita, processo de extração e método de análise (JANNUZZI 2011). Entretanto, no experimento realizado os parâmetros condições edafoclimaticas, manejo da produção, colheita e pós colheita, processo de extração e método de análise foram padronizados para todos os indivíduos, portanto podemos sugerir que a variação encontrada está relacionada ao genótipo avaliado.

Figura 4. Análise de agrupamento entre os quimiotipos, LA1 (a), LA3 (b) e LA2 (c) de *Lippia alba*.

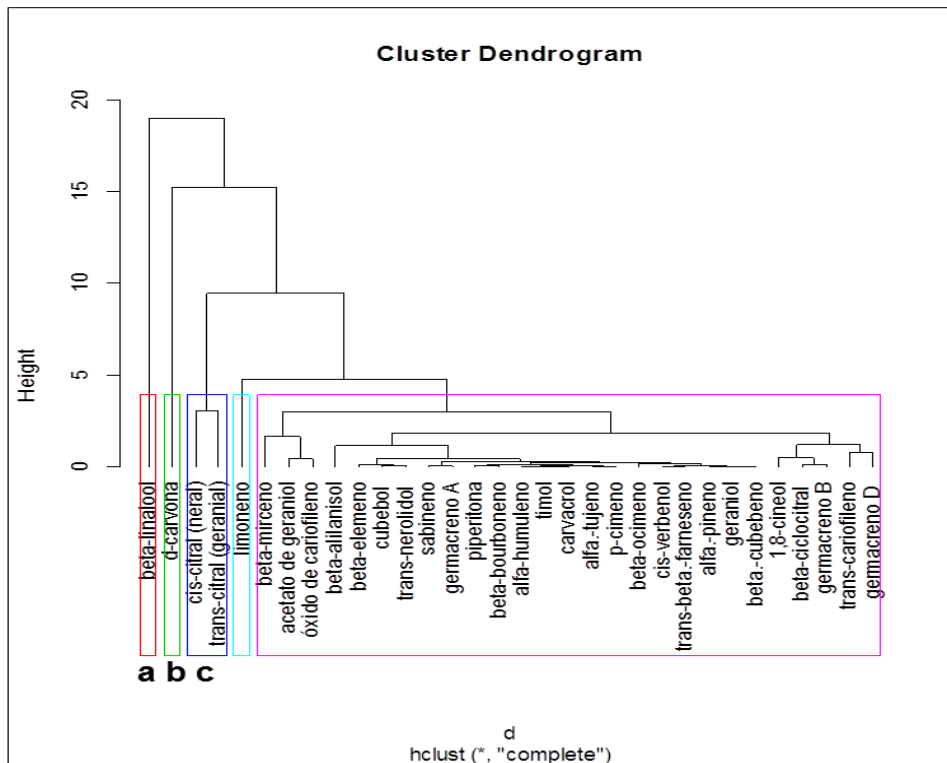
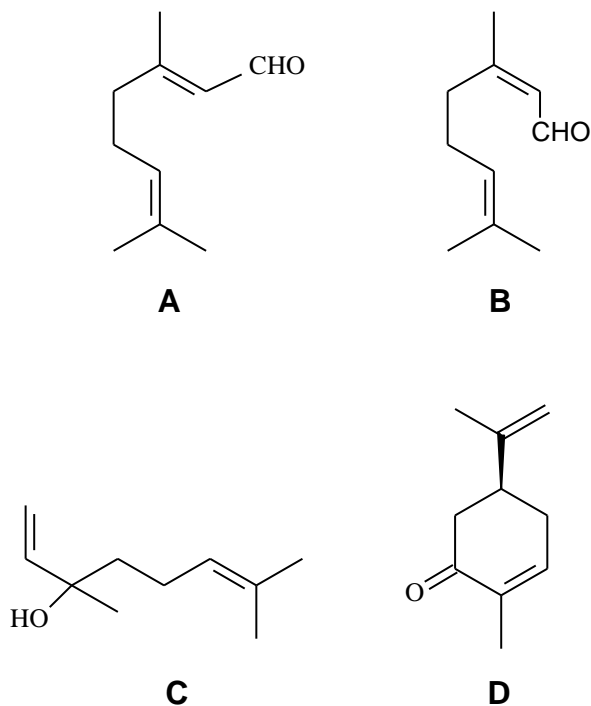


Figura 5. Estrutura química do geranial (A), neral (B), beta-linalol (C) e d-carvona (D).



Fonte: Silvia Helena Taleb Contini

O agrupamento comparando os genótipos em pares evidenciou claramente a diferença química entre dois genótipos, separando os compostos majoritários em grupos diferentes do grupo com os compostos comuns a ambos (Figuras 6; 7 e 8).

Figura 6. Análise de agrupamento entre os constituintes presentes nos quimiotipos, LA1 (a) e LA2 (c) de *Lippia alba*.

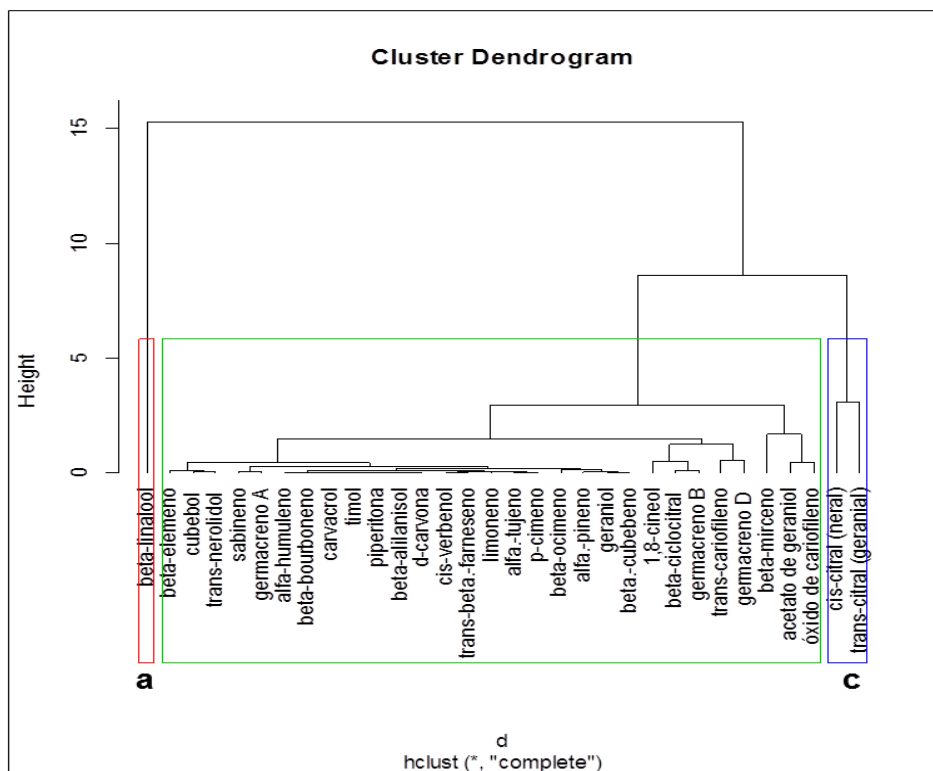


Figura 7. Análise de agrupamento entre os constituintes presentes nos quimiotipos, LA1 (a) e LA3 (b) de *Lippia alba*.

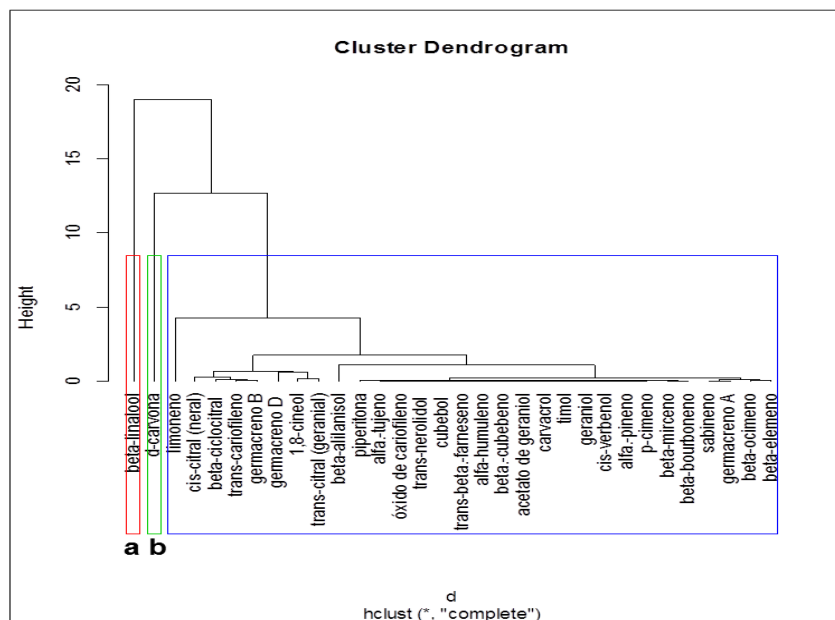
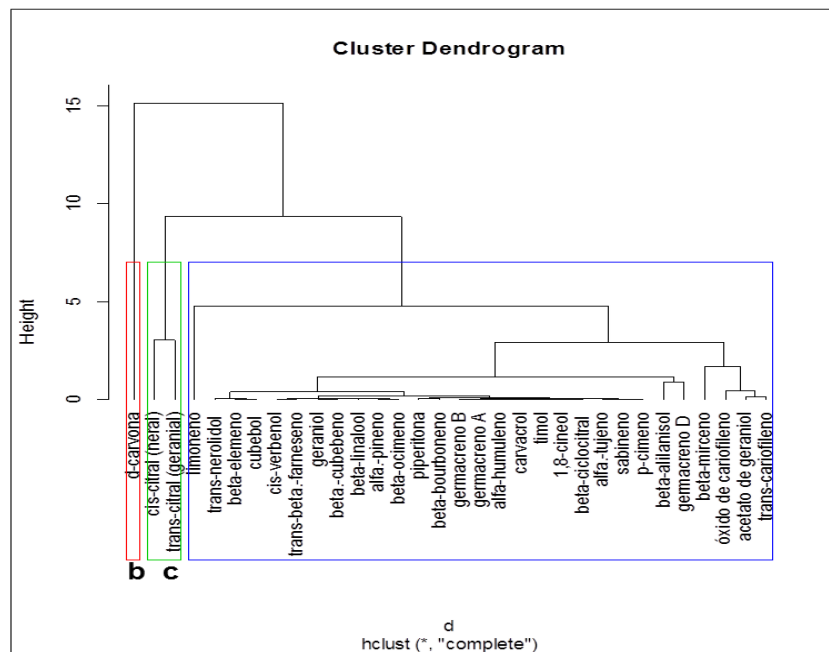


Figura 8. Análise de agrupamento entre os constituintes presentes nos quimiotipos, LA2 (c) e LA3 (b) de *Lippia alba*.



Os quimiotipos coletados na Coleção de Plantas Medicinais da Farmácia da Natureza foram muito semelhantes aos analisados por Tavares et al. (2005a), coletados no ano 2000, no Rio de Janeiro, em relação ao constituinte majoritário. Entretanto, os quimiotipos estudados por Tavares apresentaram um maior número de constituintes. Portanto, apesar dos trabalhos terem sido realizados com quase 20 anos de diferença, além de não serem cultivados no mesmo local e não serem os mesmos genótipos, foi possível evidenciar que há um predomínio de quimiotipos com esses compostos majoritários.

A ação farmacológica dos compostos majoritários presentes nos três quimiotipos são diversas. O trans e cis citral (geranial e neral) são indicados como anti-espasmódico, antiparasitário, antibactericida, antitumoral, calmante, inseticida, vasorelaxante e para enxaqueca. Sendo o geranial utilizado na indústria alimentícia, por possuir forte aroma de limão, apresentando atividade anticâncer e antifúngico e o neral tem atividades descritas como antioxidante e anti- inflamatório. O beta-linalol é mais indicado para perfumaria, devido ao seu aroma doce; além de apresentar atividade anticonvulsivante, anti-inflamatória, antioxidante e sedativa. Agindo também contra bactérias, fungos e insetos. Por fim a d-carvona, que apresenta aroma de menta tem ação contra bactérias, fungos e nematoides (TAVARES et al., 2005b).

Assim os três medicamentos produzidos pela farmácia da natureza a base de *L. alba*, podem ter sua ação prevista pelo seu quimiotipo. O beta-linalol (LA1) mais indicado para indução de sono devido sua atividade sedativa, o quimiotipo citral (LA2) com atividade calmante, vasorelaxante e o quimiotipo d-carvona (LA3) possui atividade bactericida, fungicida, e expectorante, é potencialmente anti-hipertensivo por ser diurético e relaxante.

8 CONCLUSÃO

As análises evidenciaram que os três quimiotipos cultivados na Farmácia da Natureza apresentam diferentes compostos majoritários. Portanto, há necessidade de diferenciar os quimiotipos para a produção do fitoterápico em Farmácia Viva, pois os efeitos terapêuticos poderão ser distintos.

Com base nos compostos majoritários presentes nos três quimiotipos e suas ações comprovadas cientificamente temos as seguinte indicações: LA1 usada para insônia e enxaqueca, LA2 como calmante e a LA3 indicada para pressão alta.

9 REFERÊNCIAS

AGNANIET, Huguette; MAKANI, Thomas; AKAGAH, Aristide; MENUT, Chantal; BESSIÈRE, Jean Marie. Volatile constituents and antioxidant activity of essential oils from *Lippia multiflora* Mold. growing in Gabon. **Flavour And Fragrance Journal**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 34-38, 27 out. 2004. Wiley.

ALI, Babar et al. Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. **Asian Pacific Journal Of Tropical Biomedicine**, [s.l.], v. 5, n. 8, p.601-611, ago. 2015. Anual.

ALMEIDA, Darlene Magalhães de et al. Teores de óleo essencial e flavonóides totais em amostras de *Rosmarinus officinalis* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Juiz de Fora, MG, v. 4, n. 91, p.170-175, 2010.

ALMEIDA, Joelson dos Santos et al. A Fitoterapia no Centro de Saúde da Família: um olhar sobre Práticas Integrativas no VER-SuS. **Saúde em Redes**, [s.l.], v. 4, n. 1, p.193-204, 22 jun. 2018. Associação Brasileira da Rede unida.

ÁVILA-REYES, J. A. et al. Foliar phenolic compounds of ten wild species of Verbenaceae as antioxidants and specific chemomarkers. **Brazilian Journal of Biology**, [s.l.], v. 78, n. 1, p.98-107, 26 jun. 2017. FapuNIFESP (SciELO).

BADREDDINE, Ben Slimane et al. Chemical composition of *Rosmarinus* and *Lavandula* essential oils and their insecticidal effects on *Orgyia trigotephras* (Lepidoptera, Lymantriidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Tunísia, v. 2, n. 8, p.98-103, fev. 2015.

BARREIRO, Eliezer J.; BOLZAN, Vanderlan da Silva. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, Rio de Janeiro, Rj, v. 32, n. 3, p.679-688, 2009.

BARROS, A.S.; MORAIS, S.M.; FERREIRA JUNIOR, J..M.; PINTO, C.C.C.; ALVEZ, D.F.; SOUZA, V.C.S. Composição majoritária determinada por CG/MS de óleos essenciais de duas espécies de *Mentha*. **XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química**. 2016.

BATISTA, Erix dos Santos et al. *Lippia alba* essential oil as anesthetic for tambaqui. **Aquaculture**, [s.l.], v. 495, p.545-549, out. 2018. Elsevier BV.

BROWN, W.H. Citral. **Encyclopedia Britânica**, 2018.
<https://www.britanica.com/science/citral>.

CARDOSO, R.S.; GOMES, V.B.; GOMES, A.B.; BRASIL, A.R.L.; LEITE, S.F.S.; FONSECA, S.G.C.; ROMERO, N.R.; AGUIAR, W.R.; MAGALHÃES, K.N.; KELLEN, M.S.; GUARNIZ, W.A.S.; BANDEIRA, M.A.M. Farmácias Vivas: caracterização de marcadores químicos ativos para avaliação da qualidade da matéria-prima, intermediário e fitoterápico à base de cidreira (*Lippia alba*), Quimiotipo II. **Com. Ciências Saúde**, v.28(1), p. 36-39, 2017.

CHEN, Shi-lin et al. Conservation and sustainable use of medicinal plants: problems, progress, and prospects. **Chinese Medicine**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.1-10, 30 jul. 2016.

CHIARADIA, Mariza C.; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel C. S. F.. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, Campinas, Sp, v. 31, n. 3, p.623-636, fev. 2008.

COSTA, Ineilian B.C. da et al. Ethnobotanical survey of medicinal flora in the rural community Rio dos Couros, state of Mato Grosso, Brazil. **Blacpma**, [s .i.], v. 16, n. 1, p.53-67, 2017. Anual

COSTA, J.G.M., et al. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Braz. J. Pharm.**, [s .i.], v. 15, n. 4, p. 304-309, 2005.

CUSTÓDIO, Dayana Lacerda et al. Antimicrobial Activity of Essential Oils from *Pimenta pseudocaryophyllus* and *Tynanthus micranthus*. **Brazilian Archives Of Biology and Technology**, Londrina, Pr, v. 53, n. 6, p.1363-1369, nov. 2010. Bimestral.

DEGANI, Ana Luiza G.; CASS, Quezia B.; VIEIRA, Paulo C.. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, [s.i.], v. 0, n. 0, p.21-26, 7 maio 1998.

FERREIRA, D.F. SISVAR (sistema para análise de variância de dados balanceados) v.4.3. Lavras: UFLA. 2003.

FURTADO, R.F., et al. Atividade Larvívica de Óleos Essenciais Contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Neot Entomol.**, [s.i.], v. 34, n. 5, p. 843 - 847, 2005.

GOBBO-NETO, Leonardo; LOPES, Norberto P. PLANTAS MEDICINAIS: FATORES DE INFLUÊNCIA NO CONTEÚDO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS. **Química Nova**, Ribeirão Preto ,SP, v. 30, n. 2, p.374-381, 2007. Anual. Revisão

HENNEBELLE, Thierry et al. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.i.], v. 116, n. 2, p.211-222, mar. 2008. Elsevier BV.

JANNUZZI, H et al. Avaliação agrônômica e química de dezessete acessos de erva-cidreira [*Lippia alba* (Mill.) N.E.Brown] - quimiotipo citral, cultivados no Distrito Federal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, Sp, v. 13, n. 3, p.258-264, jan. 2011.

JANNUZZI, Hermes et al. Avaliação agrônômica e identificação de quimiotipos de erva cidreira no Distrito Federal. **Horticultura Brasileira**, Brasília, Df, v. 28, n. 4, p.412-417, out. 2010.

JUNIOR, Antônio Q. da Silva et al. Seasonal and circadian evaluation of a citral-chemotype from *Lippia alba* essential oil displaying antibacterial

activity. **Biochemical Systematics And Ecology**, [s.l.], v. 85, p.35-42, ago. 2019. Elsevier BV.

KUNLE, O.; OKOGUN, J.; EGAMANA, E.; EMOJEVWE, E.; SHOK, M.. Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract. **Phytomedicine**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 59-61, jan. 2003. Elsevier BV.

LIMA, Helena Regina Pinto; KAPLAN, Maria Auxiliadora Coelho; CRUZ, Ana Valéria de Mello. Influências dos Fatores Abióticos na Produção e Variabilidade de Terpenóides em Plantas. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, Rj, v. 10, n. 2, p.71-77, ago. 2003. Quadrimestre.

LIMA, L.E.O.; NASCIMENTO, L.A.M.; SILVA, M.S.. Comercialização de Plantas Medicinais no Município de Arapiraca-AL. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s.l.], v. 18, n. 2, p.462-472, jun. 2016. Anual.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2002. 512p

MANENZHE, N. J.; POTGIETER, N.; REE, T. Composition and antimicrobial activities of volatile components of *Lippia javanica*. **Phytochemistry**, v.65, p. 2333-2336, 2004.

MESA-ARANGO, Ana Cecilia et al. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. **Memória Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Rj, v. 104, n. 6, p.878-884, set. 2009.

MONTEIRO, M.V.B., et al. Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. Leaves. **J. Ethnopharmacol.**, [s.l.], v.111, n.2, p.378-382, 2007.

NASRI, Hamid; SHIRZAD, Hedayatollah. Toxicity and safety of medicinal plants. **Journal Of Herbmед Pharmacology**, Iran, v. 2, n. 2, p.21-22, 2013. Anual.

PARTHIBAN, Ramalingam et al. Quantitative traditional knowledge of medicinal plants used to treat livestock diseases from Kudavasal taluk of Thiruvarur district, Tamil Nadu, India. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 26, n. 1, p.109-121, jan. 2016.

PEREIRA, A.M.S.; BERTONI, B.W.; SILVA, C.C.M.; FERRO, D.; TARDELLI, F.C.; CARMONA, F.; DANDARO, I.M.C.; BARBOSA, J.C.; MOREL, L.J.F.; BARBOSA, M.G.H.; ANGELUCCI, M.A.; DONEIDA, V.C. **Formulário de Preparações Extenporâneas**. Ed. Bertolucci, 234p, Ed.2, 2020.

PINA, E.S. Avaliação agronômica e atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de espécies de Verbenaceae. **Dissertação** (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 90p., 2010.

RIVAS, K.; RIVAS, C.; GAMBOA, L. Composición química y actividad antimicrobiana del aceite essencial de albahaca (*Ocimum basilicum*). **Multiciencias**, v. 5, n.3, 2015.

SANTIAGO, G.P., et al. Effects of plant extracts on the biology of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) maintained under artificial diet. **Ciênc. agrotec**, Lavras, MG, v. 32, n. 3, p. 792-796, 2008.

SANTOS, Danilo L. et al. Chemical composition of essential oils of leaves, flowers and fruits of *Hortia oreadica*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 26, n. 1, p.23-28, jan. 2016.

SCOTT, A.J.; KNOTT, M.A. A cluster analyses method for grouping means in the analyses of variance. **Biometrics**, n.30, p.507-512, 1974.

SILVA, R.E.R. da et al. Vasorelaxant effect of the *Lippia alba* essential oil and its major constituent, citral, on the contractility of isolated rat aorta. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.i.], v. 108, p.792-798, dez. 2018. Elsevier BV.

SILVEIRA, Patrícia Fernandes da; BANDEIRA, Mary Anne Medeiros; ARRAIS, Paulo Sérgio Dourado. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s .i], v. 18, n. 4, p.618-626, out. 2008. Trimestral.

SOUZA, Larissa Isabela Oliveira de et al. The chemical composition and trypanocidal activity of volatile oils from Brazilian Caatinga plants. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.i.], v. 96, p.1055-1064, dez. 2017. Elsevier BV.

TAVARES, E.S et al. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.15, n.1, p. 1-5, 2005a.

TAVARES, E. S et al. Micropropagação de Quimiotipos de *Lippia alba* Mill. N. E. Br Produtores de Citral, Carvona e Linalol. **Fitos**, Rio de Janeiro, Rj, v. 1, n. 1, p.67-73, jan. 2005b.

VILJOEN, A.M., et al. The composition, geographical variation and antimicrobial activity of *lippia javanica* (Verbenaceae) leaf essential oils. **J. Ethnopharmacol.**, v. 96, p. 271-277, 2005.

YARIWAKE, Janete H. et al. Variabilidade sazonal de constituintes químicos (triterpenos, flavonóides e polifenóis) das folhas *Maytenus aquifilium* Mart. (Celastraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s .i], v. 2, n. 15, p.162-168, abr. 2005. Trimestral.

ZABKA, Martin; PAVELA, Roman; SLEZAKOVA, Ludmila. Antifungal effect of *Pimenta dioica* essential oil against dangerous pathogenic and toxinogenic

fungi. **Industrial Crops And Products**, [s.l.], v. 30, n. 2, p.250-253, set. 2009. Elsevier BV.

ZHAO, Pengyi et al. Improvements for absolute quantitation using electrochemical mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, [s.l.], v. 443, p.41-45, set. 2019. Elsevier BV.